

## 「海洋環境修復に寄与する生物活性物質に関する研究」

- 未利用資源キヒトデ由来の植物生育制御物質 -

物質環境科学専攻 生体機能化学講座  
博士課程 2 年 石井 貴広 (指導教官: 沖野 龍文)

### < 背景・目的 >

北海道全域で毎年、大量発生を繰り返しているヒトデは、水産有用種の食害等の被害を及ぼすために定期的に駆除されている。回収後のヒトデは、利用価値が見出せないために廃棄物処理され、未利用資源となっている。そのような現状から、多様な生物活性物質を有することが知られるヒトデを有効に活用して、環境負荷低減を考慮した循環型利用法の開発が期待される。

そこで、未利用資源のヒトデから天然有用生物活性物質の探索を行い、得られた物質の機能性を明らかにし、環境負荷に配慮したヒトデ混和肥料や殺虫剤などを開発することを本研究の目的とした。

ヒトデの全道発生量の 60 % 以上を占める道東海域より、生息密度の高いキヒトデ (*Asterias amurensis* Lüken) を採集した。毒物に敏感に反応する植物のコマツナ (*Brassica campestris*) を指標に用いて、ヒトデ混和堆肥施用時における発芽および初期生育の影響を調査した。昨年度の結果から、生ヒトデと牛糞や木材系資材をベースとした堆肥素材から成るヒトデ混和堆肥は、コントロール (無処理) や特殊肥料のパーク堆肥よりもコマツナの地上部および地下部の生育をとともに促進させることがわかった。また、イエバエ幼虫の餌に対して 10 % の割合で生ヒトデや温水抽出より得た粉末ヒトデを混入すると、蛹の変態を阻害するという知見も得られた。

上記の生物試験結果により判明したヒトデのコマツナ生育促進作用やイエバエ幼虫の成育阻害作用を示す活性物質を得るために以下の分離操作を行った。なお、得られた物質の構造および化合物名に関しては、論文発表・特許申請前につき、報告書には明示しない。

### < 生物試験法 >

試料溶液 (2 mL) を含ませた濾紙上にコマツナ種子を播種後、25 °C ・ 12L / 12D の明暗サイクル条件下で 1 週間インキュベートした。試験後にコマツナの茎長 (TOP) と根長 (ROOT) および生重量を測定した。無処理のコントロールと比較して生育状態の評価を行った。

### < 温水抽出によって得た水溶性促進物質 >

凍結保存したキヒトデ (2.0 kg) を 60 °C の温水に 30 分間浸漬して抽出を行い、遠心分離でろ過した後に凍結乾燥した。得られた温水抽出物 (172 g のうち 2.0 g を使用) を水と酢酸エチルで 2 層分配した。さらに、水可溶部を水と 1 - ブタノールで 2 層分配して水溶性画分 (H-H, 1.2 g) を得た。温水抽出物より得た水溶性画分 (H-H) はコマツナの発芽および初期生育を促進させた。活性を示した水溶性画分 (H-H) を Amberlite XAD-2 および ODS カラムクロマトグラフィーを用いて分離を行うと、水で溶出した画分に強い促進効果

が認められた。得られた促進画分 (H-H-A-a, 0.48g) を水/メタノール系の溶媒を用いて、逆相 HPLC (Develosil C30-HG-5) で分離して 3 つの画分を得た。各画分について生物試験を行うと、吸着されずに溶出したポイドボリューム部 (H-H-A-a-1) に顕著な活性が表れ、保持時間 13 分に溶出した画分 (H-H-A-a-2) にも活性が認められた。得られた活性物質 (H-H-A-a-2) について、種々の機器分析を使用して構造解析を行った結果、窒素と硫黄を含む既知化合物であると同定された。

また、HPLC による分離が不十分であった活性画分 (H-H-A-a-1) をペーパークロマトグラフィーによって分離すると、ニンヒドリン呈色部が強い促進活性を示した。<sup>1</sup>H-NMR とアミノ酸分析により、呈色した活性画分はグリシンを主成分とするアミノ酸画分であることがわかった。検出された各アミノ酸およびアミノ酸混合物の活性を調べるために、アミノ酸の市販試薬を用いて生物試験を行ったが、発芽・初期生育には関与していないことが明らかになった。

そこで、不活性のアミノ酸を除去するために、活性画分 (H-H-A-a-1) をイオン交換カラムクロマトグラフィーに供すると、塩酸処理した画分に強い活性が認められた。得られた活性画分はニンヒドリン反応を示さなかったことから、アミノ酸以外の物質が活性に寄与していると考えられた。また、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C-NMR や IR などによって活性画分の解析を行うと、リファレンスのスペクトル以外何も観測されなかったことから、有機物以外の物質の存在が示唆された。ここまでの結果から推察すると、糖類やアミノ酸などの有機物以外のもの、つまり金属塩などの無機物が活性に大きく寄与していることがわかった。

さらに、活性物質の性状をみるために、植物の必須元素として知られる元素 (Ca, K, Mg, P など) を中心に 20 の元素を測定対象にして、ICP (プラズマ発光分光法) による解析を試みた。その結果、活性画分内に対象となったカチオンは約 45 % 存在していることがわかった。中でも Na と K の存在比は極めて高く、全画分中に Na が約 35 %、続いて K が約 8 % となっており、この 2 つの元素を中心に含むことが明らかとなった。試料濃度と分子量の関係から推測すると、アニオン側は Cl<sup>-</sup> などの元素であることが示唆された。また、肥料として一般的に知られている硝酸ナトリウムや硫酸、炭酸ならびに塩化カリウムなどの無機塩を用いて生物試験による活性の比較を行うと、K を含有するものが同等の活性を示した。以上のような結果から、促進活性の中心となる物質は肥料成分である KCl などの無機塩である可能性が高いと思われる。

#### <メタノール抽出によって得た水溶性阻害物質>

凍結保存したキヒトデ (950 g) を室温でメタノールに 24 時間浸漬して抽出を行った。粗抽出液を遠心分離・ろ過後、濃縮乾固してメタノール抽出物 (31 g) を得た。得られた抽出物を酢酸エチルと水で 2 層分配して水層と有機層を得た。

まず、水層 (Me-H, 29 g) は、溶離液に水/メタノール系を使用して Amberlite XAD-2 カラムクロマトグラフィーで分離し、5 つの画分 (Me-H-A ~ E) に分画した。75 %メタノールで溶出した画分 (Me-H-D) に強いコマツナ生育阻害活性がみられた。ついで活性画分 (Me-H-D) を、溶離液に水/メタノール系を用いて ODS カラムクロマトグラフィーで分離し、4 つの画分 (Me-H-D-a ~ d) を得た。このうち 75 %メタノールで溶出した画分 (Me-H-D-c, 131 mg) は、発芽・初期生育に対して顕著な阻害効果を示した。<sup>1</sup>H-NMR に

よる解析ならびに Libermann-Burchard 反応、濃硫酸反応および Carr-Price 試薬による呈色反応より、本阻害画分はステロイド系サポニンを含有することが確認された。

さらに、24 %アセトニトリル溶液で逆相 HPLC (Shim-Pack CLC-C8) を行い、75 %メタノール溶出画分 (Me-H-D-c) より 3 つの阻害画分を得たが、どの画分も混合物の状態であった。そこで、分離を容易にするために、保持時間 12 分および 14 分で溶出した阻害画分に関しては、ピリジンと無水酢酸を用いたアセチル化を行った。得られたアセチル化混合物には活性がみられなかったが、PTLC (Si-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH) および逆相 HPLC (Shim-Pack CLC-C8) を行って 2 つの化合物を単離した。得られた化合物について、種々の NMR 法や MS を用いて構造解析を行い、一方は分子量 1000 以上の既知物質と同定し、もう一方は現在構造解析中である。

#### <メタノール抽出によって得た脂溶性促進物質>

上記の分配操作によって、メタノール抽出物より得られた有機層 (酢酸エチル可溶部) は、水溶性促進画分より活性は弱いですが、コマツナ種子の生育に対して促進効果をもつことが確認できた。溶離液にクロロホルム - メタノール - 水系を使用して、有機層 (Me-EA, 1.7 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、4 つの画分 (Me-EA-A ~ D) に分画した。クロロホルム : メタノール : 水 (80:20:1) で溶出した画分 (Me-EA-C) は発芽および初期生育を促進させた。ついで活性画分 (Me-EA-C, 72 mg) を、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、4 つの画分 (Me-EA-A ~ D) を得た。クロロホルム : メタノール : 水 (85:15:1) で溶出した画分 (Me-EA-C-c, 19 mg) は、分離前の画分と同様に全体的に促進傾向があった。一方、クロロホルム : メタノール (9:1) で溶出した画分 (Me-EA-C-b, 32 mg) には、根を長くする活性が存在した。

まず、根伸長活性を示した画分 (Me-EA-C-b) については、ヘキサン : 酢酸エチル : メタノール : 水 (30:20:10:1) の展開溶媒に続いて、ヘキサンの代わりにトルエンを用いた系で繰り返し PTLC (Si-gel) を行い、R<sub>f</sub> 値 0.44 (トルエン : 酢酸エチル : メタノール : 水 = 30:20:10:1) を示す物質を単離した。この化合物の構造解析をして骨格を決定した。立体化学等の詳細については現在解析中である。

一方、促進画分 (Me-EA-C-c) は、溶離液にメタノールのみを使用して逆相 HPLC (Develosil ODS-HG-5) を行い、保持時間 25 分で溶出した部分に促進活性が認められた。<sup>1</sup>H-NMR および 2D-NMR などを駆使して構造解析を進めた結果、既知物であると同定した。また、促進画分 (Me-EA-C-c) より、展開溶媒にクロロホルム : メタノール : 水 (80:20:1) とトルエン : メタノール (4:1) を用いた PTLC (Si-gel) を行うことによって、上記化合物と同様の基本骨格を有する化合物がいくつか得られた。

#### <まとめ>

昨年度の実験結果より、生ヒトデや温水抽出より得た乾燥粉末物にはコマツナの生育やイエバエ幼虫の成育を阻害する効果が認められ、反対にヒトデ混和堆肥はコマツナ生育促進作用を有することがわかった。これらの知見と指標をもとに、ヒトデ水抽出物及びメタノール抽出物から、コマツナ種子に対して発芽抑制・阻害あるいは生育促進を示す画分を得た。促進効果が認められた水抽出物の水溶性画分からは、グリシンを主成分とする種々

のアミノ酸や K および Na を含む無機塩、さらに低分子含硫黄物質が検出された。この含硫黄低分子化合物については、活性能はあまり高くはないものの、植物の生理活性を高める活力剤的な要素をもつ可能性が考えられる。アミノ酸はコマツナの発芽・初期生育においては効果を示さなかったが、植物の栄養として吸収され、タンパク質の生合成などにも直接働くため、促進機能を有すると考えられる。また、ヒトデはグリシンやプロリン等で構成されているコラーゲンを多く含有することで知られている。グリシンは、生体内で浸透圧調節機能などの重要な役割を担っていると考えられており、作物の生育に必要とされるプロリン等は有機肥料としての用途が考えられる。K は植物の必須多量元素でもあり、活性に関しては濃度依存的に働いていると思われる。一方、Na は必須ではないが、植物によっては要求性のある「有用元素」とされており、塩生植物ではないコマツナにも Na の有用性は報告されている。Na は特に K 欠乏下において 1 価カチオンの代替的な働きをするとともに、浸透圧作出作用によって、作物の保水力や吸水力に寄与しているという報告がある。しかしながら、Na は低濃度では活性を示すものの、高濃度で存在すれば塩ストレスの影響を受けることは明白である。また、アニオンに関しては、必須元素に挙げられる元素で構成される  $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$  や  $\text{Cl}^-$  などの可能性が高いと予測して、K や Na との組み合わせと一致する肥料（試薬）を用いて生物試験を行った。その結果、K をベースとした速効性肥料の  $\text{KCl}$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、や  $\text{K}_2\text{SO}_4$  などは強い促進活性を示し、水溶性促進画分と同等な活性を示すことがわかった。一方、Na をベースとした  $\text{NaCl}$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  や  $\text{NaNO}_3$  などにも活性は見られたが、それほど強いものではなかった。ICP 分析より得た結果をもとに、試料濃度と分子量の関係からアニオンを推測し、上記の生物試験結果を照合すると、活性本体は K を含む上記のような無機塩の可能性が非常に高いという結論に至った。

また、今までヒトデの促進作用に関しては水抽出物（水溶性部）にしか着目されておらず、脂溶性部は全く着手されていなかった。植物の生育促進物質についても、脂溶性物質の報告はそれほど多くはない。本実験より、ヒトデのメタノール抽出物より得た酢酸エチル可溶部に促進効果が確認できたことは希少であると思われる。酢酸エチル可溶画分より、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分離を繰り返すと、全体的に促進傾向を示す画分と根を著しく伸ばす画分が得られた。両画分から化合物を単離して構造解析を行った。植物に含まれるある種のテルペン類が、植物の発根促進効果などを有することで知られているが、得られた活性物質に関する植物生育作用の報告は全くなく、本実験より得られた化合物の新たな機能性は注目すべき点だと考えられる。

一方、メタノール抽出物の分離より得られた水溶性画分の中に、発芽および生育を顕著に阻害する画分がみつかった。その阻害画分の主成分は Liebermann-Burchard 反応などからステロイド系サポニンであることが確認できた。植物の発芽時には酸素を要求するため、サポニンによる還元作用などによって酸素欠乏を引き起こし、発芽等が抑制された可能性が考えられる。また、庭木や観賞用として利用されるクマツヅラ科のタイワンレンギョウ (*Duranta repens*) の木陰では雑草の生育が著しく悪いという事例があり、その落葉から植物生育阻害活性を有するトリテルペノイド系サポニン (durantannin) がアレロパシー物質として発見されている。サポニン類は駆虫作用を有しており、海洋生物より様々な殺虫作用もつ化合物が検出されていることから、ヒトデから得られたサポニンもイエバエなどの幼虫に対して成育阻害作用等のアレロパシー効果を示すことが予測される。これまでの

研究では、ヒトデに含まれるサポニンが魚毒作用、駆虫作用、溶血作用、発泡作用および抗ウイルス活性や抗腫瘍活性などの薬理作用を有することは知られていたが、コマツナなどの植物に対して発芽や生育を阻害する効果は報告されておらず、環境に配慮した農業技術の開発に向けて、このような新たな機能性の応用が期待される。

本年度までの研究結果より、未利用資源のキヒトデから、コマツナに対して生育促進および阻害を示す様々な物質を単離することができた。得られた活性物質は、コマツナ以外のスプラウトであるブロッコリーやカイワレなどにも効果を示したことから、植物の生育制御物質としての利用が期待される。また、海藻は植物の栄養素となるアミノ酸、炭水化物、ミネラルやビタミンなどの物質を含有することで知られており、未利用海藻種の1つである紅藻カレキグサより得られた水抽出物などにも生育促進効果が認められた。このように、廃棄物となる海洋未利用資源を利用することで、循環型社会の形成に少しでも貢献できるように今後も研究に取り組んでいきたいと考えている。

今後の展開として、得られた活性物質の合成や化学変換等によって、機能性や活性相関を明確にすることを予定している。また、活性物質の効率的な回収法の検討および様々な生物試験（細胞毒性試験、酵素阻害試験、海藻孢子付着阻害試験や抗菌試験等）によって、ヒトデに含まれる新たな機能性を追求することで、未利用資源ヒトデの有効利用を目指す。

#### <論文>

Takahiro Ishii, Tatsufumi Okino, Minoru Suzuki, Kazunari Kuramata, and Yuji Machiguchi, Feeding-deterrent Activity of Phenylpropanoids from the Red Alga *Tichocarpus crinitus* Against the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Marine Biotechnology* **6**, S247-251. (2004).

Takahiro Ishii, Tatsufumi Okino, Minoru Suzuki, and Yuji Machiguchi, Tichocarpols A and B, Two Novel Phenylpropanoids with Feeding-Deterrent Activity from the Red Alga *Tichocarpus crinitus*. *Journal of Natural Products* **67**, 1764-1766. (2004).

#### <学会発表等>

Ishii, T., Okino, T., Suzuki, M., and Machiguchi, Y., Feeding-deterrents against the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* from the red alga *Tichocarpus crinitus*. 6<sup>th</sup> International Marine Biotechnology Conference 21-27 Sept. 2003 Chiba, Japan.

石井貴広、沖野龍文、美濃羊輔

「未利用資源キヒトデから得られた植物生育制御物質」

第8回マリンバイオテクノロジー学会、熊本、2005年5月（発表予定）。